

MÉTABOLITES SECONDAIRES FONGIQUES : Diversité de structures mais unité de fonction, la protection

par Noël ARPIN et Marie-Louise BOUILLANT*

RÉSUMÉ — Les Champignons ont une extraordinaire capacité à synthétiser les métabolites les plus variés. L'examen des γ -glutamylanilines/hydrazines et des mycosporines — ensemble de molécules à rôle protecteur vis-à-vis des microorganismes et des radiations ultraviolettes respectivement — montre bien qu'une diversité structurale peut s'exprimer malgré des origines biosynthétiques similaires (voie du shikimate et glutamine). De plus, il est montré avec l'exemple des mélanines fongiques que les Champignons utilisent diverses voies métaboliques pour la synthèse de molécules différentes mais ayant toutes le même rôle protecteur évident. En conclusion il est indiqué que la variété des métabolites fongiques doit correspondre à une nécessité écophysiologique. Les espèces qui se sont pérennisées sont vraisemblablement celles qui ont su utiliser au mieux les sous-produits de leur métabolisme pour les transformer, en fonction de leur environnement, en molécules protectrices, agents de survie.

SUMMARY — Fungi show an extraordinary ability to synthesize the most various secondary metabolites. The study of γ -glutamylanilines/hydrazines and mycosporines — all compounds with protective effect against microorganisms and UV radiations respectively — shows that an important structural diversity can be expressed despite similar biosynthetic pathways. Moreover it is known with the example of fungal melanins that fungi use several metabolic pathways to synthesize compounds, whose protective effect is clearly apparent. In conclusion we point out that the diversity of secondary fungal metabolites should correspond to an ecophysiological need. Species that have made the best use of their own by-products to transform them into protective molecules, according to their usual environment, have been the most suited for the survival.

MOTS CLÉS : champignons, métabolites secondaires, γ -glutamylanilines/hydrazines, mycosporines, mélanines, fonction de protection.

INTRODUCTION

Les Champignons offrent une extraordinaire diversité tant au niveau de leurs formes que de leurs modes de reproduction. Moins connue mais tout aussi étonnante est leur capacité à synthétiser des métabolites secondaires : le nombre

* Laboratoire de Mycochimie (Unité associée au CNRS, 1127), Institut de Chimie et de Biologie cellulaire et moléculaire, Université Claude Bernard, 69622 Villeurbanne Cedex:

déjà impressionnant de 3000 molécules fongiques recensées (TURNER, 1971; TURNER & ALDRIDGE, 1983) ne représente certainement qu'une partie infime de ce qui existe.

Bien que l'on ignore, dans la plupart des cas, les conditions précises dans lesquelles sont produits ces métabolites secondaires, nous savons que très souvent leur apparition accompagne une phase de différenciation. L'intérêt que nous leur manifestons ■ justifie parce que leur synthèse correspond à l'activation de gènes qui ne s'expriment qu'au moment de la morphogénèse.

La diversité de ces métabolites secondaires peut masquer des processus fondamentaux et généraux; aussi convient-il d'être très attentif à leurs modalités de formation, autant qu'à leurs structures. L'étude comparée des mycosporines et des γ -glutamylanilines/hydrazines nous fournit un exemple de métabolites secondaires différents bien qu'ayant une origine biosynthétique similaire.

Par ailleurs, les Champignons ont su diversifier les voies de biosynthèse conduisant à des molécules aux caractéristiques et aux propriétés voisines; ainsi, la polymérisation et l'oxydation de précurseurs variés concourent à la production de différentes mélanines fongiques selon des mécanismes qui seront ici succinctement rappelés et discutés. Nous tenterons, dans ce texte, de dégager quelques aspects essentiels relatifs à la biosynthèse et aux rôles physiologiques de ces métabolites secondaires.

I – LES COMPOSÉS PRÉAROMATIQUES ET AROMATIQUES LIÉS A LA GLUTAMINE

L'analyse des structures de la mycosporine glutamine, isolée de la partie fructifère de *Morchella esculenta*, et de l'agaritine, obtenue à partir des carpophores d'*Agaricus bisporus* (Fig. 1) montre que, dans les deux cas :

- l'un des membres du couple glutamine/acide glutamique est lié à une molécule cyclique, de type cyclohexénone ou aromatique, par l'intermédiaire de son NH_2 en α dans le premier cas, par le carbonyle en γ dans le deuxième cas.
- la fonction carboxylique liée au cycle a subi une réduction en alcool primaire.

Les études de biosynthèse de l'agaritine (SCHUTTE & al., 1972) et des mycosporines (FAVRE-BONVIN & al., 1987) ont révélé que la partie cyclique de ces molécules est issue de la voie du shikimate, soit en amont de ce dernier – plus précisément au niveau du déhydro-3 quinate – pour les mycosporines, soit en aval – au niveau de l'acide *p*-OH benzoïque – pour l'agaritine. Les principales étapes assurant la biosynthèse de ces composés ont été présentées sur la Fig. 2; notons que les intermédiaires entre le déhydro-3 quinate et la cyclohexénone n'ont pas été isolés à ce jour.

Nous allons discuter brièvement des aspects biochimiques et physiologiques relatifs à la formation de ces composés.

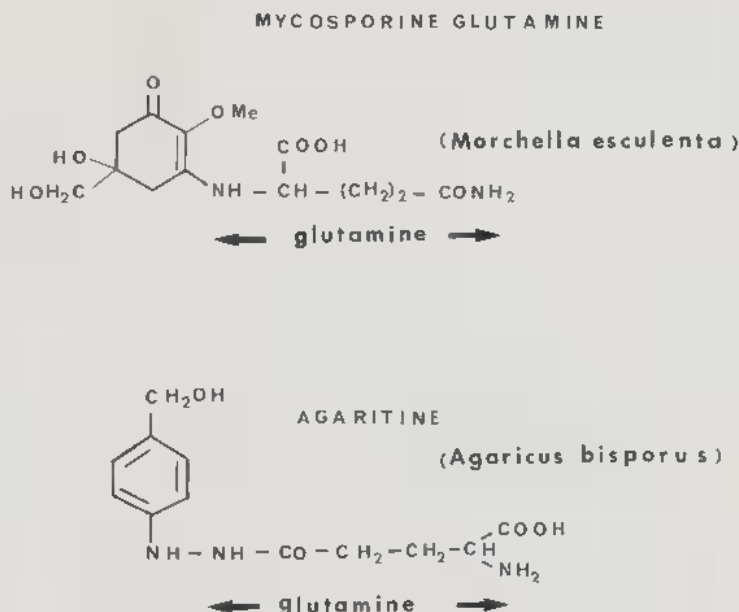


Figure 1 — Comparaison des structures de la mycosporine glutamine et de l'Agaritine.
Figure 1 — Comparison of mycosporine glutamine and agaritine structures.

Au plan biochimique, l'activation de la voie du shikimate a déjà été observée au cours de la morphogénèse fongique; de nombreux composés, issus de cette voie, tels les pigments des Macromycètes (grévillines, terphénylquinones, dérivés de l'acide pulvinique. . ., (GILL & STEGLICH, 1987)) ou les alcaloïdes de type cyclopénine-cyclopénol produits au moment de la sporulation de *Penicillium cyclopium* (NOVER & LUCKNER, 1974) illustrent ce fait. La réduction du groupement carboxylique pourrait être concomitante à la réoxydation des coenzymes réduits, mais la signification précise de ce processus n'est pas encore éclaircie.

Compte-tenu du rôle central joué par le couple glutamine/acide glutamique dans le contrôle du métabolisme azoté (MARZLUF, 1981; MOORE, 1984), la fixation de ces acides aminés constitue un processus important d'immobilisation de l'N. Il y a là un moyen de neutraliser l' NH_3 toxique. Cette immobilisation de l'N peut être momentanée ou prolongée. Dans certains cas, comme celui de *Pyronema omphalodes*, il y a chute très importante de la teneur en nor-mycosporine glutamine au moment de la libération/germination des spores (ARPIN & BOUILLANT, 1981); dans d'autres cas, plus fréquents, la mycosporine glutaminol présente dans les spores n'est pas remaniée au cours de la germination (PITTET & al., 1983).

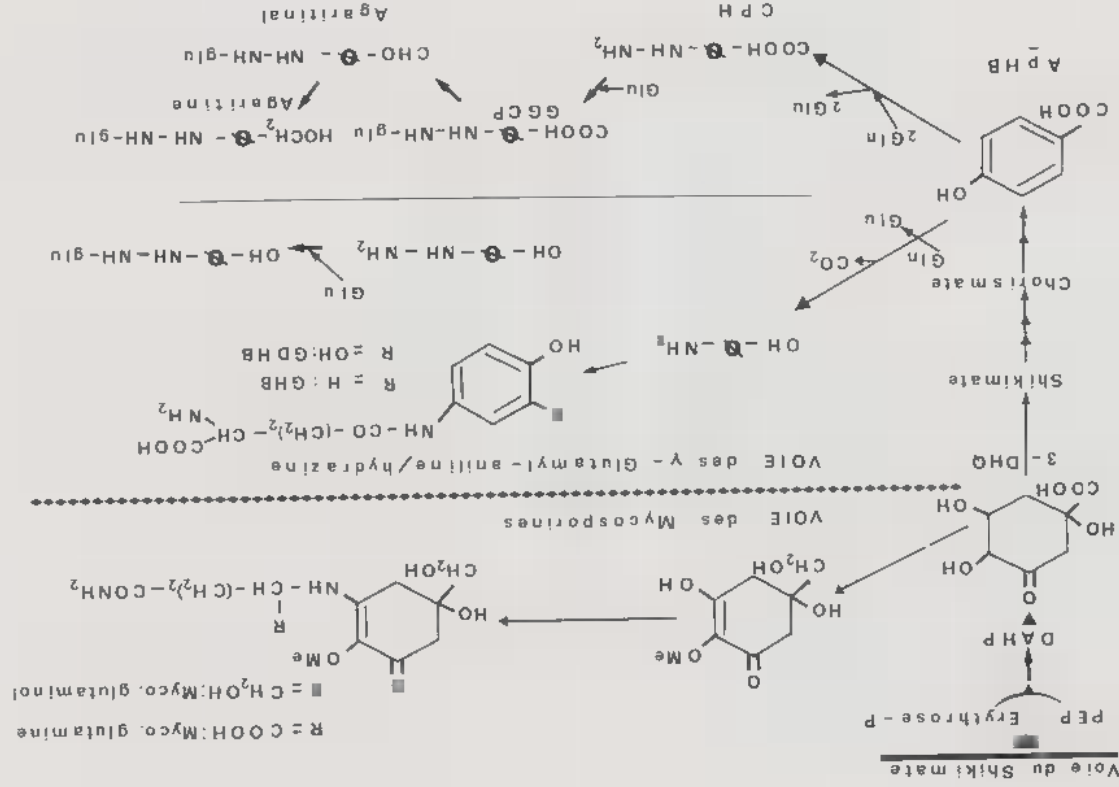


Figure 2 — Origine biosynthétique commune des Mycosporines et des γ -glutamylanilines/hydrazines.
 Figure 2 — Common biosynthetic origine of mycosporines and γ -glutamyl anilines/hydrazines.

En ce qui concerne l'agaritine du Champignon de couche, GIGLIOTTI & LEVENBERG (1964) ont montré que cette molécule pouvait servir comme donneur du résidu γ -glutamyle; ils ont, en effet, isolé d'*Agaricus bisporus*, une enzyme, la γ -glutamyltransférase, particulièrement active dans le transfert du groupement γ -glutamyle sur des accepteurs tels que l'eau (hydrolyse) et d'autres amines et hydrazines. Selon RAST & al. (1981), le résidu γ -glutamyle de l'agaritine se fixe sur le NH_2 de la *p*-OH aniline pour donner la N-(γ -L-glutamyl) *p*-hydroxyaniline (GHB *in* Fig. 2), précurseur, *via* le GDHB (Fig. 2), des mélanines de cette espèce.

A ces aspects biochimiques de régulation, se superpose très vraisemblablement un rôle de protection vis-à-vis de l'environnement. Du fait de leur intense absorption à 310 nm, zone limite du rayonnement UV au niveau de la biosphère, les mycosporines participent activement à la photoprotection, comme cela fut démontré pour les spores de *Glomerella cingulata* (BROOK, 1981). En cédant son extrémité γ -glutamyle, l'agaritine participe indirectement à la photoprotection (formation de mélanine protégeant les spores de l'*Agaricus bisporus* (RAST & al., 1981)). En outre, les hydrazines de type agaritine ont été nettement impliquées dans un rôle de défense efficace vis-à-vis des microorganismes du milieu (STIJVE & al., 1986).

Ainsi, selon les nécessités dues à l'environnement, les espèces fongiques, à partir des mêmes matériaux de base, ont synthétisé des métabolites secondaires différents, chacun étant plus efficacement adapté soit à un rôle de photoprotection, soit à un rôle de défense vis-à-vis d'espèces concurrentes.

II — MÉLANINES FONGIQUES

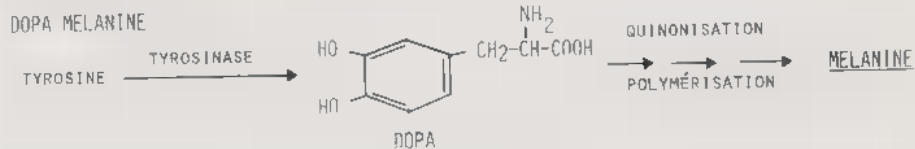
En avant propos, il est important de préciser que ce texte ne constitue pas une mise au point sur ce très vaste sujet. Pour plus d'informations nous renvoyons le lecteur au travail de BELL & WHEELER (1986), beaucoup plus exhaustif, ainsi qu'à la revue sur les pigments des Champignons supérieurs de GILL & STEGLICH (1987). Nous voulons simplement ici dégager certains concepts concernant ces molécules qui sont un nouvel exemple de la diversité des moyens développés par les Champignons pour aboutir à une même fonction.

1. Le concept de mélanine

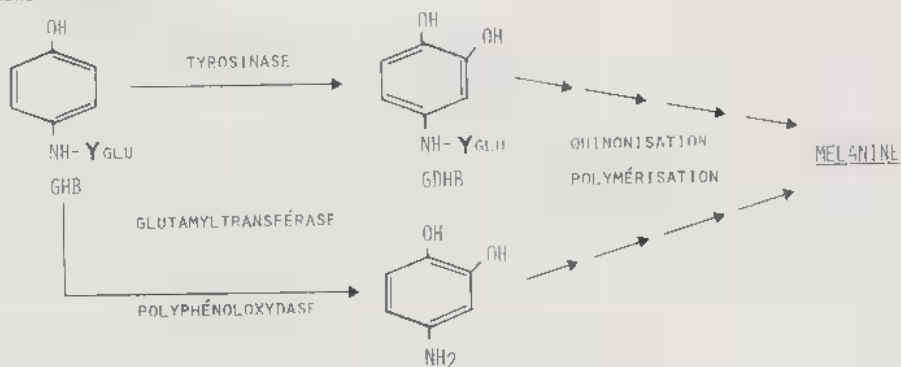
Le nom de mélanine est attribué, sans présumer de leur nature chimique, aux pigments noirs, bruns ou gris que l'on rencontre aussi bien chez les animaux que chez les végétaux ou les microorganismes. Il faut cependant en exclure les pigments bruns présents chez les plantes vertes qui sont de nature anthocyanique, non polymérisés.

Chez les Champignons (Macro ou Micromycètes) ces pigments colorent le plus souvent les formes reproductrices (spores), de résistance (sclérototes, chlamydospores) ou les structures d'attaque (appressoriums), c'est à dire les parties responsables de la survie de l'espèce.

ORIGINE BIOSYNTHÉTIQUE: VOIE DU SHIKIMATE



GDHB MELANINE



CATECHOL MELANINE



ORIGINE BIOSYNTHÉTIQUE: VOIE DES POLYACÉTATES

DHN MELANINE

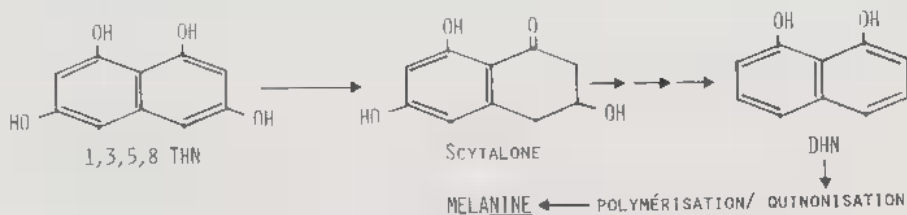


Figure 3 — Précurseurs clés des différentes voies de biosynthèse des mélanines chez les Champignons.

Figure 3 — Keys precursors of several biosynthetic pathways of fungal melanins.

Du point de vue biochimique, elles se définissent comme des polymères aromatiques, susceptibles de s'associer avec d'autres macromolécules : protéines, sucres... et de cette nature même découle leur difficulté d'étude. Leur insolubilité, dans l'eau ou les solvants organiques, les rend difficiles à extraire sans dégradation, mais l'utilisation de méthodes dégradatives conduit à des mélanges complexes d'analyse difficile.

Chez les Champignons, il faut distinguer :

– les mélanines produites de manière extracellulaire, que l'on retrouve dans les milieux de culture ou dans l'environnement mycélien. Celles-ci peuvent être synthétisées à partir de substrats divers, endogènes (issus du Champignon lui-même) ou exogènes (issus du milieu), sous l'action d'enzymes extracellulaires ou tout simplement de l'oxygène de l'air.

Ces mélanines contribuent à la formation de l'humus; ce sont, *pro parte*, les acides humiques fongiques qui constituent parfois une partie importante (jusqu'à 30 %) de la biomasse produite par les Champignons.

– les mélanines liées à la paroi fongique, où elles s'accumulent, ce qui se traduit en microscopie électronique par une zone opaque aux électrons. Leur formation, exclusivement intracellulaire, explique leur spécificité. Leurs biosynthèses ont fait l'objet, cette dernière décennie, de nombreuses études; celles-ci ont montré que, suivant l'espèce considérée, les Champignons utilisent diverses voies du métabolisme secondaire pour cette synthèse pigmentaire.

2. Biochimie des mélanines

La figure 3 résume les diverses possibilités rencontrées que nous commenterons brièvement :

DOPA mélanine

C'est la mélanine du monde animal où elle a été bien étudiée. Le substrat clé est la dihydroxyphénylalanine (DOPA), issue de la tyrosine sous l'action de la tyrosinase. La réaction suivante est la formation d'une diquinone – la Dopakinone – susceptible de nouvelles transformations mais également de polymérisation. Ce premier exemple illustre un autre fait unitaire chez les mélanines : dans tous les cas il y a quinonisation suivie de polymérisation des molécules phénoliques. Le polymère obtenu peut être le produit à la fois d'auto ou d'hétéropolymérisation des différents monomères, ce qui conduit, du simple point de vue phénolique, à des macromolécules complexes.

Il est un fait paradoxal : contrairement à une idée depuis longtemps admise, la DOPA mélanine n'a pas, en réalité, été démontrée comme mélanine liée à la paroi fongique. Les Champignons possèdent l'enzyme (la tyrosinase commerciale est celle du Champignon de couche) et le ou les substrats (tyrosine, DOPA) de cette réaction. Ils sont donc très certainement capables de produire ce type de mélanine, mais son existence « constitutive » n'est pas établie.

Par contre, des études récentes ont montré la présence de trois autres types de mélanine :

GDHB mélanine

Bien étudié par RAST & al. (1981), la GDHB mélanine a pour substrat le γ -glutamyl dihydroxybenzène (GDHB) issu, sous l'action d'une enzyme qui pourrait être la tyrosinase (*in vitro* cette enzyme réalise cette réaction), du γ -glutamyl hydroxybenzène (GHB), lui-même formé par la voie du shikimate.

Le GDHB est, comme la DOPA, susceptible de quinonisation et, avec ou sans leur groupement glutamyle, les quinones obtenues sont polymérisées.

Ce type de mélanine colore les spores du Champignon de couche *Agaricus bisporus*. STUSSI & RAST (1981) ont démontré la présence ubiquiste du GHB dans le carpophore et même dans le mycélium du Champignon; par contre, le GDHB n'est présent que dans les lamelles où apparaît le pigment corrélativement à la différenciation sporale.

Le brunissement facile des tissus fongiques lors du vieillissement, de traumatismes ou de maladies (tache bactérienne) laisse supposer la formation de mélanines. Leur nature n'est pas connue mais il est probable qu'elles sont, comme les mélanines extracellulaires, formées à partir des différents substrats présents ou libérés à l'endroit de l'agression.

DHN mélanine

Les premières analyses élémentaires de cette mélanine ont révélé qu'elle contient une proportion d'N bien inférieure aux deux précédentes.

L'isolement de mutants apigmentés et l'utilisation de substances chimiques inhibitrices de mélanogénèse ont permis, d'abord à BELL & WHEELER (1986), chez *Verticillium dahliae*, puis à d'autres auteurs sur d'autres Champignons, d'établir que cette mélanine a pour précurseurs toute une série de penta-acétates de type naphthalénique, la substance la plus facilement isolée étant la scytalone.

L'originalité de cette voie de biosynthèse, par rapport aux précédentes est qu'elle utilise uniquement des unités acétyles, que les intermédiaires ne comportent pas d'N et qu'elle procède par une succession de réductions (réductases) et de déshydratations (déshydratases) pour aboutir au dihydroxynaphtalène (DHN), déjà soupçonné par ALLPORT & BU'LOCK (1960), et BU'LOCK (1967), susceptible de quinonisation et de polymérisation.

Il semble bien établi aujourd'hui que la DHN Mélanine est fréquente chez les Ascomycètes. La connaissance de cette voie de biosynthèse s'est révélée d'un grand intérêt appliqué, car de nombreux Ascomycètes pathogènes réalisent leur parasitisme par le biais d'appressoriums mélanisés. Lorsque la pigmentation de ces structures est supprimée, elles perdent leur rigidité et donc leur pouvoir de pénétration. Cette observation motive actuellement de nombreuses études sur ce sujet.

Catéchol mélanine

Nous citerons pour mémoire ce dernier type de mélanine formé d'unités catéchol, quinonisées et polymérisées, qui colore les téliosporés d'*Ustilago maydis* (PIATELLI & al., 1965) car les résultats obtenus par voie exclusivement dégradative demandent confirmation.

3. Structure et fonction des mélanines

La fonction de **Protection** des mélanines découle très certainement de leurs propriétés physiques et chimiques :

- elles absorbent les rayonnements, particulièrement les ultraviolets, elles possèdent de nombreux groupements quinoniques susceptibles d'exister sous forme de radicaux libres. En conséquence, elles rendent les Champignons résistants aux diverses radiations soit en les absorbant, soit en dispersant l'énergie, les structures sous-jacentes se trouvant de ce fait protégées;

- elles peuvent à la fois jouer le rôle de réducteurs et d'oxydants; elles sont d'une grande stabilité chimique : elles permettent donc à l'organisme de résister aux agressions chimiques et enzymatiques des autres organismes présents, sans négliger le fait que leur dégradation même relargue des composés phénoliques toxiques pour l'agresseur;

- elles sont des polymères aromatiques rigides, insolubles et hydrophobes, donc participent probablement à la résistance à la dessiccation et à la chaleur.

En conclusion, la **Protection** pourrait être, comme chez les animaux, le rôle principal et peut-être unique, des mélanines chez les Champignons.

Bien qu'en l'absence de ces métabolites de différenciation des mutants apigmentés soient aptes à se reproduire, il semble que les mélanines soient, pour certaines espèces, indispensables à leur survie. Elles constituent, parmi bien d'autres, l'un des moyens mis en œuvre par le monde fongique pour sa défense. Cette notion «d'utilisation» de métabolites secondaires, issus ou composés parfois de produits du métabolisme primaire (tyrosine, acide glutamique..) pour accomplir des fonctions physiologiques essentielles doit être soulignée. Pour croître et se différencier le Champignon peut être amené à accumuler les métabolites les plus divers, mais ces molécules ne sont rarement des «déchets» *sensu stricto*. L'organisme les réutilise, soit comme réserves, soit pour sa défense. Cela semble évident pour les mélanines, moins pour d'autres molécules; il est pourtant probable que les espèces qui se sont pérennisées sont celles qui ont su, le plus «économiquement» et le plus «intelligemment» possible réutiliser leurs sous-produits comme agents de survie.

BIBLIOGRAPHIE

- ALLPORT D.C. and BU'LOCK J.D., 1960 - Biosynthetic pathways in *Daldinia concentrica*. *J. Chem. Soc.* 1960 : 654-662.
- ARPIN N. and BOUILLANT M.L., 1981 - Light and mycosporines. In : TURIAN G. & HOHL H.R., *The Fungal Spore : Morphogenetic Controls*. London, Academic Press : 434-454.
- BELL A.E. and WHEELER M.H., 1986 - Biosynthesis and functions of fungal melanines. *Annual Rev. Phytopathol.* 24 : 411-451.
- BROOK P.J., 1981 - Protective function of an UV absorbing compound associated with

- conidia of *Glomerella cingulata*. *New Zealand J. Bot.* 19 : 299-304.
- BU'LOCK J.D., 1967 — Fungal metabolites with structural functions. In : *Essays in Biosynthesis and Microbial Development*. London, Wiley & Sons : 1-18.
- FAVRE-BONVIN J., BERNILLON J., SALIN N. and ARPIN N., 1987 — Biosynthesis of mycosporines : mycosporine glutaminol in *Trichothecium roseum*. *Phytochemistry* 26 : 2509-2514.
- GIGLIOTTI H.J. and LEVENBERG B., 1964 — Studies on the γ -glutamyltransferase of *Agaricus bisporus*. *J. Biol. Chem.* 239 : 2274-2284.
- GILL M. and STEGLICH W., 1987 — Pigments of Fungi (Macromycetes). *Fortschr. Chem. Organ. Naturstoffe* 51 : 317 p.
- MARZLUF G.A., 1981 — Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in Fungi. *Microbiol. Rev.* 45 : 437-461.
- MOORE D., 1984 — Developmental biology of the *Coprinus cinereus* carpophore : metabolic regulation in relation to cap morphogenesis. *Exp. Mycol.* 11 : 411-451.
- NOVER L. and LUCKNER M., 1974 — Expression of secondary metabolism as part of the differentiation process during the idiophase development of *Penicillium cyclopium* Westling. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 166 : 293-305.
- PIATELLI M., FATTORUSSO E., NICOLAUS R.A. and MAGNO S., 1965 — The structure of melanins and melanogenesis. V. *Ustilago* melanin. *Tetrahedron* 21 : 3229-3236.
- PITTET J.L., BOUILLANT M.L., BERNILLON J., ARPIN N. et FAVRE-BONVIN J., 1983 — Sur la présence de mycosporines-glutamine réduites, nouvelles molécules, chez plusieurs Deutéromycètes. *Tetrahedron Lett.* 24 : 65-68.
- RAST D.M., STUSSI H., HEGNAUER H. and NYHLEN L.E., 1981 — Melanins. In : TURIAN G. & HOHL H.R., *The Fungal spore : Morphogenetic Controls*. London, Academic Press, 507-531.
- SCHÜTTE H.R., LIEBISCH H.W., MIERSCH O. und SENF L., 1972 — Untersuchungen zur biosynthese des agaritins in *Agaricus bisporus*. *Anales Chim.* 11 : 899-903.
- STIJVE T., FUMEAUX R. and PHILIPPOSIAN G., 1986 — Agaritine, a *p*-hydroxymethylphenylhydrazine derivative in cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*), and in some of its wild-growing relatives. *Deutsche Lebensmittel Rundschau* 82 : 243-248.
- STUSSI H. and RAST D.M., 1981 — The biosynthesis and possible function of γ -glutaminyl-4-OH benzene in *Agaricus bisporus*. *Phytochemistry* 20 : 2347-2352.
- TURNER W.B., 1971 — *Fungal Metabolites*. London, Academic Press.
- TURNER W.B. and ALDRIDGE D.C., 1983 — *Fungal Metabolites II*. London, Academic Press.